

## NADP 磷酸酶 (NADPase)活性测定试剂盒说明书

(货号: G0895W48 微板法 48 样)

### 一、产品简介:

NADP 磷酸酶 (NADPase)主要存在于植物组织中的一种水解酶,与 NADK<sub>1</sub>一起调控 NAD<sup>+</sup>和 NADP<sup>+</sup>之间的平衡。该酶能够催化 NADP<sup>+</sup>(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)的水解反应,去除其 2'-磷酸基团,生成 NAD<sup>+</sup>(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)和无机磷酸(Pi)。本试剂盒通过测定无机磷的量来测定 NADPase 活性。

### 二、试剂盒组成和配制:

| 试剂名称 | 规格                          | 保存要求    | 备注  |
|------|-----------------------------|---------|---|
| 提取液  | 提取液 60mL×1 瓶                | 4°C保存   |   |
| 试剂一  | 液体 30mL×1 瓶                 | 4°C保存   |   |
| 试剂二  | 粉体 mg×1 支                   | -20°C保存 | 用前甩几下使试剂落入底部,再加 0.7mL 蒸馏水,混匀溶解备用。               |
| 试剂三  | 液体 8mL×1 瓶                  | 4°C保存   |   |
| 试剂四  | A:粉体 mg×1 瓶<br>B:液体 2mL×1 瓶 | 4°C保存   | 临用前向每瓶 A 试剂加 1.8mL 的 B 液,再加 23.2mL 的蒸馏水,混匀溶解备用。 |
| 标准品  | 粉体 mg×1 支                   | 4°C保存   | 若重新做标曲,则用到该试剂。                                  |

【注】: 全程操作需无磷环境;试剂配置用新枪头和玻璃移液器等,也可用一次性塑料器皿,避免磷污染。

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅、冰和蒸馏水。

### 四、NADP 磷酸酶 (NADPase)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

- ① 组织样本:称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C 离心 15min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例提取

- ② 细胞样本:先收集细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细胞加入 1mL 提取液;超声波破碎细胞(冰浴,功率 20%或 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);4°C 约 12,000rpm 离心 10min,取上清作为待测样品。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10<sup>4</sup>):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

#### 2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 700nm。
- ② 试剂解冻至室温或放在 37°C 水浴 5-10 min;在 EP 管中依次加入:

| 试剂名称(μL)          | 测定管 | 对照管 |
|-------------------|-----|-----|
| 试剂一               | 190 | 200 |
| 样本                | 100 | 100 |
| 试剂二               | 10  |     |
| 混匀, 37°C 孵育 30min |     |     |
| 试剂三               | 40  | 40  |

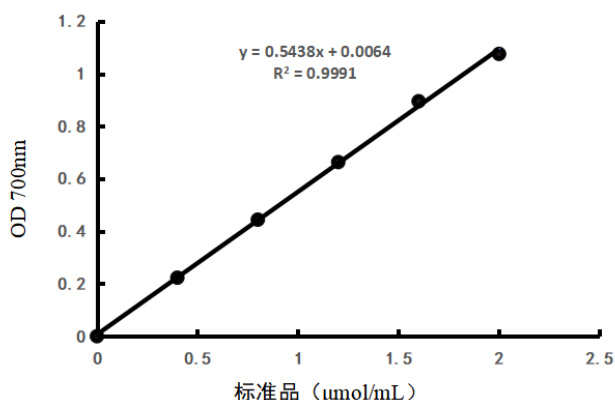
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测。

④ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 上清液   | 50  | 50  |
| 试剂四   | 200 | 200 |
| 混匀，室温静置 3min（若仍浑浊，可全部取出至离心管中，5000rpm 离心 5min，再等量如 200μL 转移至 96 孔板中），于 700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。 |     |     |

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.5438x + 0.0064$ ，x 是标准品摩尔浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )，y 是  $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白分解  $\text{NADP}^+$  产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力( $\mu\text{mol/h/mg prot}$ )= $[(\Delta A - 0.0064) \div 0.5438 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 12.5 \times (\Delta A - 0.0064) \div \text{Cpr}$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解  $\text{NADP}^+$  产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力( $\mu\text{mol/h/g 鲜重}$ )= $[(\Delta A - 0.0064) \div 0.5438 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 12.5 \times (\Delta A - 0.0064) \div W$

4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞分解  $\text{NADP}^+$  产生  $1\text{nmol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力( $\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}$ )= $[(\Delta A - 0.0064) \div 0.5438 \times V2] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 25 \times (\Delta A - 0.0064)$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.1mL； V2---酶促反应总体积，0.34mL；

T---反应时间，1/2 小时； W---样本鲜重，g； 500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液( $50\mu\text{mol/mL}$ )：标准品用 1mL 蒸馏水溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2  $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。